

## ESTUDO MORFOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DE FUSOS DE *MICROSPORUM CANIS*

Cássio Odnei Garcia MUNHOZ (1), Pedro BERTOLINI (2) e  
Antonio Carlos Ferraz CORRÊA (3)

### RESUMO

Os componentes dos macroconídios de *Microsporum canis* foram investigados através de reações histoquímicas, e sua morfologia estudada ao microscópio óptico, de fase e polarização. Os macroconídios apresentam esqueleto hialino que forma septos transversais os quais separam as lojas que contêm material citoplasmático. Este esqueleto é provavelmente representado por uma mucilagem calósica, pois cora-se somente com azul de anilina em solução acetificada; é envolto por uma parede que apresenta reação PAS positiva provavelmente relacionada à presença de celulose e/ou quitina e também, foram ali evidenciados grupos sulfidril e disulfeto. Esta parede é birrefringente, o que indicaria a orientação de seus componentes ao nível molecular. As lojas estão presentes em número variável nos elementos maduros, ao passo que nos jovens ela é única. Têm paredes próprias que são PAS positivas. O citoplasma apresenta material basófilo difuso digerível pela RNase; ali são evidenciadas inclusões de fosfolípidos e gordura neutra sob a forma de glóbulos ou grânulos. A presença de DNA não pôde ser constatada pela reação de Feulgen e foram detectados os seguintes radicais proteicos: amino, fenol, indol, sulfidril, dissulfeto e guanidil.

### INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são fungos que parasitam os tecidos corneificados em virtude de atividade fisiológica na qual utilizam a queratina.

Caracterizam-se por apresentarem formações especiais, os fusos ou macronídios (closterósporos), cuja significação funcional ainda não é bem conhecida; as características destes permitem, ao lado da morfologia da colônia, a diferenciação dos cogumelos pertencentes aos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Os fusos aparecem nos meios de cultura artificiais; seriam segundo alguns Autores, um tipo particular

de clamidósporos ou conídios especializados, apresentando-se como estruturas grandes, em forma de fuso, alongadas e com parede espessa, divididos em várias células através de septos transversais.

Dentre os dermatófitos, a espécie *Microsporum canis* assume particular importância, porque se trata de cogumelo ceratinolítico, atacando preferencialmente os pelos e regiões ceratinizadas do cão, podendo transmitir-se a crianças e raramente em adultos.

Em virtude da sua patogenia, interessou-nos estudar o comportamento histoquímico dos seus macroconídios.

Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

(1 e 3) Professores Assistentes

(2) Professor Docente Livre

## MATERIAL E MÉTODOS

As culturas de *M. canis* usadas foram obtidas de cabelos de crianças contaminadas, semeados em ágar-Sabouraud. Após o crescimento foram feitos esfregaços em lâminas e deixados secar em temperatura ambiente. Outras amostras foram fixadas em formalina a 10%, incluídas em parafina na forma usual e cortadas em secções de 7  $\mu$  de espessura. Tanto os esfregaços quanto os cortes, estes após desparafinação e hidratação, foram submetidos aos métodos de coloração rotineira (H.E., tricrômico de Mallory, coloração de contraste pela nigrosina) e também observados em microscopia com contraste de fase e campo escuro. Esfregaços e cortes embebidos em água destilada (índice de refração 1,333) foram usados para o estudo da birrefringência, com luz polarizada. A maioria das técnicas de histoquímica empregadas neste trabalho está contida em LANGERON<sup>5</sup>, LISON<sup>7</sup> e PEARSE<sup>9</sup>. Para o estudo dos mucopolissacarídes contendo grupos 1-2 glicol, os cortes e esfregaços foram tratados pela reação do ácido periódico-reativo de Schiff (HOTCHKISS<sup>4</sup>), antes e após os seguintes tratamentos: acetilação (McMANUS & CASON<sup>8</sup>), saponificação (SPICER & LILLIE<sup>10</sup>), amilase salivar (LISON<sup>7</sup>) e da celulase (solução do enzima a 1% em pH 6,0, tampão McIlvaine), usando-se também o método de SCHULZE (1922) para a pesquisa da quitina e celulose. O estudo dos grupos ácidos contidos nos mucopolissacarídes foi feito através das seguintes colorações: azul de alcian em pH 1,0 (LEV & SPICER<sup>6</sup>), para grupos sulfatos e pH 2,5 (LISON<sup>7</sup>); aldeído fucsina (GABE, 1958); azul de toluidina, solução a 0,1% em pH 1,5 (tampão citrato) e em soluções a 0,01%, em pH 2,2 e 3,4 (tampão de McIlvaine). Essas colorações foram empregadas antes e após metilação dos cortes e esfregaços (esterificação dos grupos ácidos carboxílicos através de uma solução de HCl a 0,05 N em metanol) segundo FISCHER & LILLIE<sup>2</sup> e ainda após metilação seguida de saponificação.

O estudo dos lípides foi efetuado através dos seguintes métodos: Sudan IV (MICHAELIS, 1901), Sudan Black (LISON, 1960), teste de BAKER (1946) e sulfato de azul Nilo (CAIN, 1947). As colorações para lípides foram controladas através do uso de metanol-clorofórmio (PEARSE, 1960), em partes iguais e de piridina (PEARSE, 1960), à temperatura de 60°C, durante 24, 48, 96 e 120 horas.

Para a investigação de grupos reativos de proteínas, empregaram-se as seguintes reações: ninhidrina-reativo de Schiff (YASUMA & ITCHKAWA, 1953), para grupos amino; ferricianeto-férrico (ADAMS, 1956) para grupos sulfidríla; ácido tioglicólico seguido de ferricianeto férrico (ADAMS, 1956), para grupos dissulfeto; p-dimetilaminobenzaldeído-nitrito (ADAMS<sup>1</sup>) para grupos indol; reação de SAKAGUCHI (mod. BAKER, 1956), para grupos guanidil e a reação de MILLON (seg. BAKER, 1956) para grupos fenol. Todas as reações foram controladas através do emprego dos seguintes bloqueios: ácido nitroso (PEARSE, 1960), para grupos amino, ácido periódico (HADLER & col.<sup>3</sup>)(\*) para grupos sulfidríla, ácido perfórmico (ADAMS<sup>1</sup>) para grupos indol, benzoilação (PEARSE, 1960), para o grupo guanidil e a iodação para o grupo fenol (PEARSE, 1960).

## RESULTADOS

I — *Morfológicos* — Os macroconídios de *M. canis* são estruturas fusiformes, constituídas por esqueleto hialino muito refringente; esse esqueleto inclui septos entre as lojas, separando-as e servindo-lhes de sustentação (Fig. 1A); não se cora pela hematoxilina e eosina, porém assume a cor azul com o tricrômico de Mallory.

Envolvendo o tecido de sustentação existe a parede do fuso, que se apresenta escura em cortes corados e não corados. Essa membrana é lisa nos fusos jovens e maduros, porém bastante sinuosa nas formas em degeneração. Quando o macroconídio é cortado transversalmente, essa estrutura mostra birrefringência ao exame em microscopia de polarização (Fig. 2).

(\*) Para se verificar a validade do bloqueio de grupos sulfidríla e dissulfeto pelo ácido periódico, fez-se a reação de PERLS, para a detecção de FE+++; esse elemento, fortemente redutor, pode dar resultados falsos na pesquisa de grupos -SS- e -SH-, através do uso de ferricianeto férrico (HADLER & col.<sup>3</sup>).

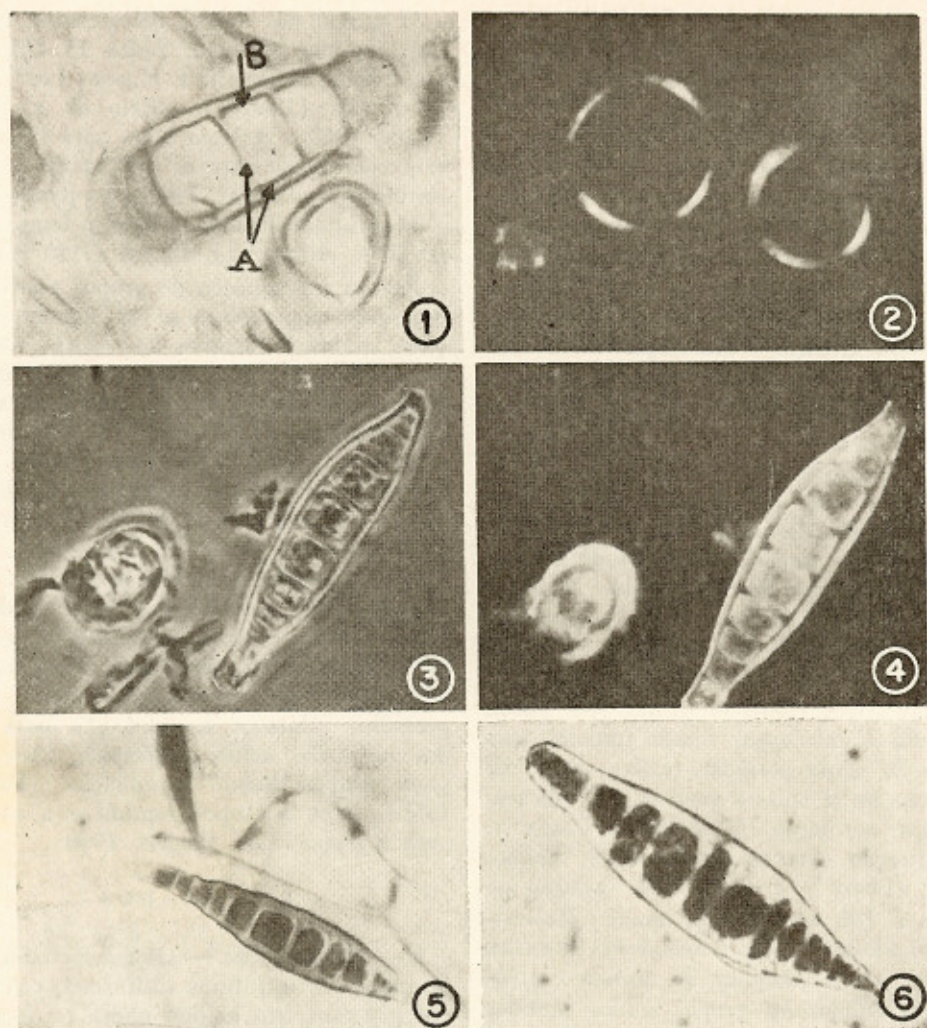


Fig. 1 — Corte longitudinal (coloração pelo PAS). 45 x. Fig. 2 — Corte transversal mostrando birrefringência da parede. 45 x. Fig. 3 — Observação em microscopia de fase. 45 x. Fig. 4 — Observação em campo escuro. 45 x. Fig. 5 — Coloração pelo ferricianeto férrico (radical SH). 45 x. Fig. 6 — Coloração pelo Sudan negro (presença de lípidos). 45 x.

As lojas, que constituem as células dos macroconídios, apresentam-se em número variável, de forma aproximadamente cilíndrica, com secção esférica nos cortes transversais; nas formas maduras e velhas as células estão envoltas por uma parede bem nítida (Fig. 1B); nos macroconídios jovens não se observam lojas.

O citoplasma das lojas apresenta grânulos e material difuso que se coram intensamente com a hematoxilina; a observação após co-

loração de contraste com a nigrosina, mostra a presença de glóbulos incolores de tamanhos variados.

II — *Histoquímicos* — a) Mucopolissacarídeos — a reação do PAS, positiva na parede celular e na membrana externa, foi sensível ao tratamento pela acetilação. O esqueleto de sustentação apresentou reação débil ou duvidosa ao PAS. O emprego tanto da amilase salivar quanto da celulase não

alterou a reação positiva da parede das lojas e da membrana externa do esqueleto.

O teste de SCHULZE para a demonstração da quitina foi negativo em todas as estruturas dos macroconídios.

A investigação de mucopolissacárides contendo grupos ácidos, revelou que as estruturas dos macroconídios não se coram pelo azul de alcian em pH 1,0 e 2,5, pela aldeído-fucsina e nem pelo azul de toluidina em pH 1,5 e 2,2; o citoplasma das lojas apresenta

granulações que mostram metacromasia com azul de toluidina em pH 3,4, coloração que foi abolida nos cortes e esfregaços previamente tratados pela metilação. A saponificação não reverteu, no entanto, a metacromasia do citoplasma nos cortes e esfregaços previamente metilados.

Na Tabela I estão os resultados obtidos para mucopolissacárides presentes nos fusos do fungo estudado.

TABELA I

Resultados dos testes histoquímicos específicos para mucopolissacárides, aplicados aos macroconídios de *Microsporium canis*

Testes histoquímicos	P.F.	E.S.	P.C.	C.	G.
PAS	+++	±	+++	—	—
Acet. + PAS	—	—	—	—	—
Acet. + Sap. + PAS	++	±	++	—	—
Amilase + PAS	i	i	i	—	—
Celulase + PAS	i	i	i	—	—
Diafanol + Clor. Zn. iod.	—	—	—	—	—
AA pH 1,0	—	—	—	—	—
AA pH 2,5	—	—	—	—	—
AF	—	—	—	—	—
AT pH 1,5	—	—	—	—	—
AT pH 2,2	—	—	—	—	—
AT pH 3,4	—	—	—	++	—
Metilação + AT pH 3,4	—	—	—	—	—
Metilação + sap. + AT pH 3,4	—	—	—	—	—

Legenda: P.F. — parede do fuso; E.S. — esqueleto de sustentação; P.C. — parede celular; C. — citoplasma das lojas; G. — glóbulos; Acet. — acetilação; Sap. — saponificação; Clor. Zn. iod. — cloreto de zinco iodado; AA — azul de alcian; AF — aldeído fucsina; AT — azul de toluidina; ± — reação débil a duvidosa; ++ — reação moderada; +++ — reação forte; i — inalterado.

b) Proteínas — O citoplasma das lojas se mostrou positivo nos testes histoquímicos que evidenciam a presença dos grupos amino, fenol, indol, sulfidril, dissulfeto e guanidil. A parede do fuso, no entanto, foi positiva apenas à reação do ferricianeto férrico com e sem tratamento prévio pelo ácido tioglicólico. A parede celular e o esqueleto de sustentação não reagiram aos testes indicativos da presença de grupos proteicos.

Os resultados para proteínas são apresentados na Tabela II.

c) Lípides — Os esfregaços quando corados pelo Sudan IV e Sudan Black, mostraram que os glóbulos contidos no citoplasma das lojas coram-se intensamente em ala-

ranjado e azul respectivamente. Essas colorações foram abolidas após o uso da solução de metanol-clorofórmio em partes iguais e de piridina a 60°C durante 120 horas. O tratamento por essas soluções por tempos menores foi insuficiente para eliminar as colorações com os referidos reagentes. O sulfato do azul Nilo, usado para diferenciar gorduras neutras e ácidos graxos, revelou que a maioria dos fusos coram-se em azul; existem, contudo, em certo número deles, glóbulos intracitoplasmáticos de tamanho variável corados em rosa. O tratamento dos esfregaços com solução de metanol-clorofórmio eliminou a coloração rosa, mas não alterou a azul. A ribonuclease eliminou a cor azul

TABELA II

Resultados dos testes histoquímicos para grupos reativos de proteínas encontradas em macroconídios de *M. canis*

Testes histoquímicos	P.F.	E.S.	P.C.	C.	G.
N.S.	—	—	—	+	—
Ác. nitr. + N.S.	—	—	—	—	—
Ferricianeto férrico	+++	—	—	+++	—
Ác. períód. + Fer. fér.	—	—	—	—	—
Ác. períód. + ác. tiogl. + Fer. fér.	+++	—	—	+++	—
DAMB + nitrito	—	—	—	+++	—
Ác. perfórmico + DAMB + nitrito	—	—	—	—	—
Sakaguchi	—	—	—	+++	—
Benzoilação + Sakaguchi	—	—	—	—	—
Milon	—	—	—	++	—
Iodação + Milon	—	—	—	—	—

Legenda: P.F. — parede do fuso; E.S. — esqueleto de sustentação; P.C. — parede celular; C. — citoplasma; G. — glóbulos; N.S. — ninhidrila Schiff; ác. períód. — ácido periódico; ác. tiogl. — ácido tioglicólico; Fer. fér. — ferricianeto férrico; DAMB — p/dimetilamino-benzaldeído; — negativo; ++ — reação moderada; +++ — reação forte.

TABELA III

Resultados dos testes histoquímicos específicos para lípides, aplicadas nos macroconídios de *Microsporium canis*

Testes histoquímicos	P.F.	E.S.	P.C.	C.	G.
Sudan IV	—	—	—	—	+++
Metanol + clor. + Sudan IV	—	—	—	—	—
Piridina + Sudan IV	—	—	—	—	—
Sudan black	—	—	—	—	+++
Metanol + clor. + Sudan black	—	—	—	—	—
Piridina + Sudan black	—	—	—	—	—
Sulfato de azul do Nilo	—	—	—	—	+++A e R
Ribon. + Sulfato de azul do Nilo	—	—	—	—	+++R
Metanol + cloro + S.A.N.	—	—	—	—	+++A
Baker	—	—	—	—	+++
Piridina + Baker	—	—	—	—	+++

Legenda: P.F. — parede do fuso; E.S. — esqueleto de sustentação; P.C. — parede celular; C. — citoplasma; G. — glóbulos; clor. — clorofórmio; Ribon. — ribonuclease; S.A.N. — sulfato azul Nilo; A — coloração azul; R — coloração rósea; — não corado; +++ — coloração forte.

mas não a rósea. O teste de Baker foi positivo para os glóbulos sudanófilos, embora o tratamento prévio pela piridina não tenha impedido tal reatividade. Os resultados para lípides obtidos nos macroconídios acham-se condensados na Tabela III.

d) Ácidos nucleicos — Todas as estruturas dos macroconídios foram negativas à reação de Feulgen para evidenciação de ácido desoxirribonucleico. A substância basófila corada pela hematoxilina, distribuída di-

fusamente no citoplasma dos fusos, mostrou-se sensível ao tratamento pela ribonuclease, uma vez que a basofilia foi eliminada após a ação enzimática.

#### DISCUSSÃO

Os resultados histoquímicos obtidos permitem uma série de considerações a respeito da natureza química dos constituintes morfo-



lógicos dos fusos ou macroconídios. Assim, verificou-se que a sua parede, bem como a das lojas, apresenta mucopolissacárides contendo grupos 1-2 glicol; esse carboidrato, embora PAS positivo, não pode ser correlacionado, com base nos resultados, à presença de celulose ou quitina, uma vez que as paredes se mostraram negativas aos métodos específicos e à digestão pela celulase; todavia, nos cogumelos, a quitina e a celulase podem estar associadas, tornando-se ambas negativas aos testes que a caracterizam (LANGERON, 1949).

Tanto a parede do fuso quanto a celular não mostraram a presença de mucopolissacárides contendo grupos ácidos (sulfato ou carboxílico), tampouco revelaram a existência de substâncias lipídicas.

A pesquisa de grupos reativos de proteínas evidenciou que a parede do fuso contém radicais sulfidríla e dissulfeto, no entanto, na parede celular não existem substâncias de natureza proteica.

A birrefringência apresentada por ambas as paredes, revela que existe uma orientação assimétrica molecular dos seus componentes estruturais. Além disso, na parede do fuso, a presença da cruz negra de polarização, nos cortes transversais, demonstra sua constituição fibrilar, disposta em lâminas concêntricas. Quanto ao esqueleto de sustentação, é difícil fazer alguma interpretação a respeito dos seus componentes químicos. Foi negativo aos testes histoquímicos empregados, corando-se apenas pelo azul de anilina em solução acetificada e não se corou com corantes básicos; esse comportamento sugere a presença de uma mucilagem calósica. No que se refere às lojas, os resultados mostraram que o material basófilo difuso está constituído de ácido ribonucleico; os glóbulos contidos no citoplasma são ricos em fosfolípidos; nos macroconídios jovens e maduros, além de fosfolípidos existem glóbulos de gordura neutra.

O citoplasma das lojas se revelou rico também em proteínas contendo grupos indol do triptofano, fenol de tirosina, amino de lisina ou hidroxilisina, guanidil de arginina, sulfidríla e dissulfeto respectivamente da cisteína e cistina.

#### SUMMARY

#### *Morphological and histochemical study of the macroconidia of Microsporium canis*

The components of the macroconidia of *Microsporium canis* were studied by histochemical methods, and their morphology described as observed at the light, phase and polarization microscopies.

The macroconidia have a hyaline skeleton, with transversal septa separating compartments or thecae containing cytoplasmic material. This skeleton is probably formed by a mucilage callosity since it stains only with aniline blue in acetic solution. It is surrounded by a membrane which gives PAS positive reaction, probably related to its cellulose and/or chitin contents and presents sulphhydryl and disulphide groups. This membrane is birrefringent, which would indicate that these components exhibit some sort of regular pattern at the molecular level.

Thecae are present in variable numbers in the mature splindles, being single in the young ones. They have their own wall which is PAS positive. Their cytoplasm contains diffuse basophilic material removable by RNAase. Also present are either globules or granules containing phospholipids and neutral fat. Feulgen's reaction for DNA was negative. The following protein terminal groups were demonstrated: amino phenol, indol, sulphhydryl, disulfide and guanidine.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, C. W. M. — A p-dimethylamino-benzaldehyde-nitrate method for histochemical demonstration of tryptofane, and related compounds. *J. Clin. Path.* 10:56-62, 1957.
2. FISHER, E. R. & LILLIE, R. D. — The effect of methylation on basophilia. *J. Histochem. Cytochem.* 2:81-87, 1954.
3. HADLER, W. A.; ZITTI, L. M.; HOFLING, M. A. C. & SILVEIRA, S. R. — Significado histoquímico da reação do ferrocianeto férrico. *Ciência e Cultura* 20:358, 1968.
4. HOTCHKISS, R. D. — A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.* 16:131-141, 1948.

5. LANGERON, M. — *Précis de Microscopie*. Paris, Masson et Cie., 1949.
6. LEV, R. & SPICER, S. S. — Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* 12:309, 1964.
7. LISON, L. — *Histochimie et Cytochimie Animales. Principes et Methodes*. 5<sup>ème</sup> Ed. Paris, Gauthiers Villiar, 1960.
8. McMANUS, J. F. A. & CASON, J. E. — Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. I — Periodic acid methods. *J. Exp. Med.* 91:651, 1950.
9. PEARSE, A. G. E. — *Histochemistry, Theoretical and Applied*. 2<sup>nd</sup> Ed. London, J. & A. Churchill Ltd., 1960.
10. SPICER, S. S. & LILLIE, R. D. — Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. *J. Histochem. Cytochem.* 7:123-125, 1959.

Recebido para publicação em 28/2/1973.